

2. Einleitung zum experimentellen Teil

Sehr verschiedene Viren weisen oft in ihrer Struktur oder Funktion überraschende Ähnlichkeiten auf. Deshalb ist es wichtig, gut erforschte Viren wie Polioviren noch besser zu verstehen. Die Ergebnisse können dann andere unbekanntere Viren erklären helfen.

2.1. Ist Neutralisation von Polioviren Strukturänderung der Viren oder Aggregation?

Es ist erstaunlich, daß so grundlegende Dinge wie die Neutralisation von Polioviren noch nicht endgültig geklärt sind. Diese Arbeit soll zeigen, ob Polioviren in Aggregaten, durch sauren pH oder Serumzugabe, verändert sind oder nicht. Änderungen der optischen Dichte (OD) der Viruspartikel verraten große, strukturelle Verschiebungen, besonders der RNS. Zur genauen Bestimmung der Absorption ist es notwendig, die gemessene OD von der Streuung der Partikel zu trennen.

Schon 1957 wurde von Engländer und Epstein (270) eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, in Virussuspensionen die wirkliche Absorption von der Streuung zu trennen; wahrscheinlich geriet diese Methode in Vergessenheit, weil der Rechenaufwand sehr groß war. Die Lichtstreuungen verschiedener Partikel unterscheiden sich sehr, z.B. Stäbchen von Kugeln, Monomere von Polymeren in Lösung (Doty & Steiner 1950, Pangonis et al. 1957). Durch doppellogarithmische Darstellung im Bereich von 437-546 nm als reiner Kontrolle der Streukurve können diese Probleme jedoch gelöst werden, weil für jede Kurve die individuelle Streuung errechnet werden kann. Durch die Bestimmung der Streuung können nun Protein- und NS-Konzentrationen genauer, ohne Streuung, bestimmt werden (Arnold & Jung 1986). Die Streuung E ändert sich mit der Potenz a (jenach Partikelgröße 2 oder 4) und kann verschiedene Steigungen b haben. Hieraus ergibt sich eine Hyperbel.

$$E = b \times \lambda^a$$

Durch Logarithmierung beider Seiten ergibt sich daraus eine lineare Gleichung, die in der Region des Spektrums ohne Absorption bestimmt werden kann.

$$\log E = \log b + a \log \lambda$$

Die Untersuchungen sollten klären, ob sich die Struktur im Inneren der Viren durch die Antikörper verändert, oder ob die Partikel nur aggregiert werden; d.h. ob die Absorption der RNS bei 260 nm verändert wird oder ob nur die Streuung erhöht wird. Zur Auswertung der Ergebnisse wurden in dieser Arbeit käufliche Programme verwendet, sowie ein selbsterstelltes (Bergmann & Bergmann 1988), siehe Anhang 1, das die Methode von Engländer und Epstein für den Computer bei allen Wellenlängen anwendbar macht. So konnte die Frage geklärt werden, ob Bindung von Antikörpern wirklich nur Pseudoneutralisation durch Verklumpen hervorruft.

2.2. Wo liegen die antigenen Regionen von Polioviruspartikeln?

Über Computerprogramme hergestellte Listen geben einen Überblick über die bei PV bislang eindeutig festgelegten antigenen AS. Zur Suche nach weiteren antigenen Regionen wurden

Antigenitäts- und Strukturvorhersageprogramme verwendet, die auch anderen bei der Bestätigung von oder Suche nach antigenen Regionen bei PV helfen mögen.

Mit Hilfe eines strukturdarstellenden Programms und den PV-Strukturdaten aus der Brookhaven Proteindatenbank konnten die antigenen Aminosäuren auf der Oberfläche von Poliovirus dargestellt werden. Auch diese Abbildungen erlauben eine konzentriertere Suche nach weiteren antigenen Aminosäuren.

2.3. Wie sieht eine antigene Region von Polioviruspartikeln aus?

Zur näheren Charakterisierung der Struktur von Epitopen wurde die Antigenität von Peptiden des VP2 von PV1 im Dot-Test mit Seren und monoklonalen Antikörpern untersucht. Die Ergebnisse wurden mit einer Reihe von Computerprogrammen ausgewertet. So wurde versucht, die durch die empfindlichen Tests mit erfaßten Kreuzreaktionen (Sibbald & White 1987) auszuschließen und stark antigene Regionen zu erkennen.

VP2 besitzt eine stark immunogene Schlaufe zwischen β -Strang E und F. Das Peptid 2162 - 2173, an Träger gebunden, prägt Kaninchen für eine Immunantwort mit neutralisierenden Ak gegen diese Region nach Impfung mit Mahoneyviren (PV1-Stamm)(Emini et al. 1984b). Es wurde in dieser Arbeit versucht, eine Erklärung für die starke Reaktion dieser Region zu finden und eine Einordnung neutralisierender und nichtneutralisierender Antikörper nach der Art der erkannten Epitope vorzunehmen.

3. Material und Methoden

3.1. Puffer

PBS (phosphate buffered saline, 0,15 M NaCl):

Lösung A :	3 M NaCl	175,32 g/l aqua bidest.
Lösung B :	0,5 M Phosphatpuffer	
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	73,15 g
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	12,28 g
		ad 1 l aqua bidest.

Mischung pro 1 aqua bidest.: 50 ml Lösung A + 30 ml Lösung B

Alle Lösungen werden autoklaviert.

Cacodylatpuffer :

99 mM NaCl	5,742 g
1 mM Na-Cacodylat	214 mg
0,2 mM $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	40,7 mg

pH7 durch HCl einstellen und mit aqua bidest auf 1l auffüllen

autoklavieren

bei 4°C aufheben

vor erstem Gebrauch pH bei 25°C kontrollieren

MES (20mM Morpholinoäthansulfonsäure):

Morpholinoäthansulfonsäure 0,39 g/100 ml

pH 6.6

Nach Bedarf wurden diesem Puffer verschiedene Konzentrationen an CaCl_2 oder MgCl_2 zugefügt.

(Good et al. 1966)

Die hier angeführten Puffer sind Standardpuffer, die für die Messungen der optischen Dichte vielfach verwendet wurden. Alle übrigen Puffer sind bei der betreffenden Methode aufgeführt.

3.2. Viren

Poliovirus Typ 1, Mahoney :

Pool 46,	$1,7 \times 10^{12}$ PBE/ml,	1,33 mg Virus/ml
Pool 47,	7×10^{11} PBE/ml,	1,94 mg Virus/ml
Pool 58,	3×10^{12} PBE/ml,	3,57 mg Virus/ml

Poliovirus Typ 2, MEF₁ :

Pool 122,	7×10^{11} PBE/ml,	3,40 mg Virus/ml
-----------	----------------------------	------------------

Poliovirus Typ 3, 1658 :

Pool 94,	$1,6 \times 10^{12}$ PBE/ml,	6,30 mg Virus/ml
----------	------------------------------	------------------

Für die Aufarbeitung von Peptiden wurden ausschließlich Mahoneyviren verwendet.

3.3. Seren und Antikörper

"+" bedeutet Serumgewinnung nach dem Töten des Tieres.

3.3.1. Seren und Antikörper für Aggregationsversuche:

Seren und Antikörper gegen Poliovirus Typ 1 :

Kaninchenserum	155 +	gegen ganzes Virus, Nt-Titer lg 50% = 4,5
"	63 +	gegen VP1, negatives Kontrollserum
"	64 +	gegen VP2, " "
"	65 +	gegen VP3, Nt-Titer lg 50% = 1

Ascites 19.9, monoklonaler IgM, MNt-Titer 3,5

Ascites 19.2, monoklonaler IgG, MNt-Titer 4,5

Der Ascites wurde in Mäusen hergestellt.

Seren und Antikörper gegen Poliovirus Typ 2 :

Kaninchenserum	54 +	gegen ganzes Virus, Nt-Titer lg50% etwa 5
----------------	------	---

Hybridoma-Überstand 7J3 monoklonaler IgM gegen Typ 2, Maus, Nt-Titer lg50% >4

Hybridoma-Überstand 7J6 monoklonaler IgG gegen Typ 2, Maus, Nt-Titer lg50% = 3

Die Hybridomazellen stammten aus der Fusion von Mausplasmazytomzellen mit Mausmilzzellen.

Serum gegen Typ 3 :

Mausserum 107 +	gegen ganzes Virus, MNt lg Verd. = 3
-----------------	--------------------------------------

3.3.2. Seren und Antikörper für Peptidtests:

Seren und Antikörper gegen Poliovirus Typ 1:

Kanincheserum	28 + gegen ganzes Virus, Nt-Titer lg50%=5
"	42 + gegen leere Kapside, Nt-Titer lg50%=4
"	43 + gegen leere Kapside, Nt-Titer lg50%=3,5
"	44 + gegen ganzes Virus, Nt-Titer lg50%=5
"	45 + gegen ganzes Virus, Nt-Titer lg50%=5,5
"	153-157 + gegen ganzes Virus in 1:10 Verdünnungen, Nt-Titer lg50%= 5,5; 5,2; 5,3; 4,3; 2,1

Ascites monoklonaler Antikörper der Maus gegen VP2 von PV1:

Ak gegen bekannte Sequenzen:	Epitop nach K. Wiegers (persönliche Mitteilung)	Bindung (RIP)
IgG(1) 27.18	(AS 1-153)	2,1
IgG(1) 27.77	(AS 164-170)	3,6
IgG(1) 34.3	(AS 164-170)	2,2
Ak gegen unbekannte Sequenzen:		
IgG(1) 10.6		2,0
IgG(1) 27.9		3,5
IgG(1) 27.33A		1,8
IgG(1) 27.53		1,0
IgM 45.2		5,0

Nur mAk 34.3 neutralisierte; 27.77 und 34.3 binden Virionen; 27.53 bindet als einziger keine H-Partikel. Die Bindung der Ak an Viren wurde durch Radioimmunpräzipitation (RIP) bestimmt (Wiegers et al. 1990).

Serum gegen Poliovirus Typ 2:

Kanincheserum	54 + gegen ganzes Virus, Nt-Titer lg50% etwa 5
---------------	--

Serum gegen Poliovirus Typ 3:

Kanincheserum	55 + gegen ganzes Virus, Nt-Titer lg50%=4
---------------	---

3.4. Methoden

Ein großer Teil dieser Arbeit waren Verbesserungen der Methoden. Um den Umfang des Ergebnisteils nicht durch Methodisches zu sprengen, werden in kurzen Kommentaren zu den Versuchen nur die Ergebnisse der Veränderungen erwähnt.

3.4.1. Virusproduktion und Virusaufarbeitung

Die Polioviren wurden in HeLa-Zellen vermehrt und in CsCl-Gradienten gereinigt nach einer Methode von Drzeniek & Bilello (1974). Die Aufarbeitung der Viren erfolgte nach den in unserem Labor üblichen Methoden. (Tessmer & Dernick 1990, Harms 1988)

3.4.2. Aufarbeitung von Seren und Antikörpern

Antiseren wurden nach Dernick et al. (1983) hergestellt. Hybridomaüberstände wurden nach Uhlig et al. (1983) gewonnen. Ascites wurde nach Wiegers et al. (1986) produziert.

3.4.3. Plaque-Test

Die virale Neutralisation wurde mit Plaque-Tests nach Dernick et al. (1983) getestet.

3.4.4. pH - Titration

10-60 μ l große Proben von Poliovirus in PBS mit 3 M CsCl werden in 1 ml bzw 0,5 ml PBS, Cacodylatpuffer oder MES so verdünnt, daß die Optische Dichte (OD) bei 260 nm zwischen 0,4 und 0,8 liegt. Als Kontrolle dient der jeweilige Puffer ohne Virus. Der pH-Wert der Probe wird gemessen. (Koch 1984, Hopkins & Sinsheimer 1955, Müri 1987) In einer thermostatisierten Küvette (Eigenbau) wird die Probe auf 25°C gebracht und ein Spektrum der Probe zwischen 210 und 610 nm aufgenommen. Als Fotometer dient ein Ultrospec 4050 (LKB), dem ein Apple //e angeschlossen ist mit Software von LKB, die für die Thermoküvette und die pH-Titration bearbeitet wurde. Das aufgenommene Spektrum wird gespeichert und wahlweise ausgedruckt. Danach wird die gleiche Probe mit 0,05 - 0,5 n HCl angesäuert und ein neues Spektrum aufgenommen. Diese Schritte werden so lange wiederholt, bis keine Säuretitration mehr erwünscht ist. Ist der letzte pH-Wert nicht so niedrig gewählt, daß die Viren zerstört sind, läßt sich an dieser Stelle eine Basentitration mit 0,1 - 0,5 n NaOH anschließen, die wiederum in kleinen Schritten erfolgt.

3.4.5. Spektrenauswertung: Trennung von Streuung und Absorption

Die gespeicherten Spektren werden für die Weiterverarbeitung zum Teil gekürzt. Ein selbstgeschriebenes Spektrenauswertungsprogramm (listing in Anhang 1) bereitet die Spektren für eine Auswertung nach Englander und Epstein vor.

Das Maximum der Virusabsorption liegt bei 260 nm. Im sichtbaren Licht absorbieren die Viren nicht. Abb.3.1 zeigt das Spektrum einer Viruslösung bei pH 7 ohne Virusaggregation.

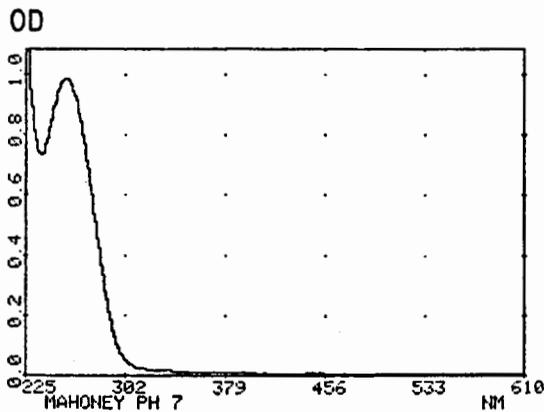


Abb.3.1 Spektrum einer Virus-suspension (Mahoney, Typ 1) bei pH 7

Der theoretische Verlauf einer Streulichtkurve in Abhängigkeit von der Wellenlänge ist eine Hyperbel mit hohen Werten an Absorption im UV-Bereich und Werten, die sich der X-Achse (nm - Achse) nähern, je größer die Wellenlänge ist. Die Streuungsextinktion E hängt von der Wellenlänge W ab, die durch die Partikelgröße beeinflusst wird. Nach dem Rayleigh-Gesetz ist die Intensität des Streulichtes proportional zur vierten Potenz der Wellenlänge. Da dieses Gesetz aber nur für bestimmte Partikelgrößen stimmt, wurde es von Engländer und Epstein durch die allgemeinere Form der Potenz a der Wellenlänge und die Konstante b erweitert:

$$E = b \times W^a$$

Logarithmiert man diese Gleichung mit dem Logarithmus zur Basis 10, so erhält man eine Geradengleichung:

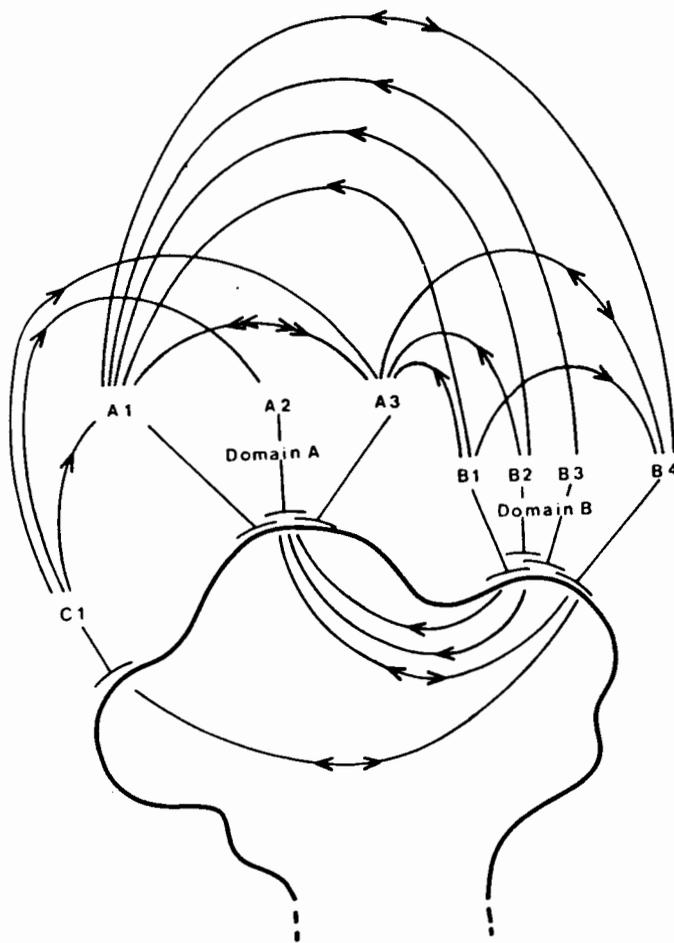
$$\lg E = \lg b + a \lg W$$

Da im sichtbaren Bereich keine Virusabsorption vorliegt, ist die Gerade, die allein durch Streuung entsteht, berechenbar. Zieht man die Werte dieser Geradengleichung von einem Virusspektrum mit Streuung ab, so erhält man das reine Absorptionsspektrum der Viruslösung unabhängig von der Größe der zur Zeit in der Lösung vorhandenen Partikel. (Abb.3.2)

Der größte Teil der Absorption einer Viruslösung entsteht durch die Basen der Nukleinsäure im Virusinneren. Etwa 95% einer optischen Dichte bei 260 nm entstehen durch die virale RNA, etwa 82% bei 280 nm. Diese Werte gelten aber nur unter Standardbedingungen, z.B. Poliovirus in PBS bei pH 7. Wird die RNA durch Hitze, pH oder andere Bedingungen denaturiert, so erhöht sich ihre optische Dichte durch das Auseinanderfallen der Basen (Aufheben des "basestackings"). Aus der Änderung der optischen Dichte kann also auf eine Änderung der RNA-Struktur (Konformation) geschlossen werden.

Peptide erklärt einerseits, warum ein Peptid verschiedene Gruppen von Immunzellen ansprechen kann (Es paßt sich dem MHC und den mit ihm wirkenden Komponenten an.), aber auch andererseits nur wenige MHC-Moleküle in einem Individuum nötig sind, um eine riesige Anzahl verschiedener, fremder Peptide zu binden (Verschiedene Peptide können von einem MHC-Molekül erkannt werden.). (Vajda et al. 1990)

Es gibt sowohl den Fall, daß ein Ak die Wirkung eines zweiten verstärkt, als auch, daß zwei Ak sich gegenseitig verstärken. Nichtneutralisierende Ak verstärken bei einigen von Mücken übertragenen Viren die Wirkung neutralisierender Ak z.B. zumindest um das 3- bis 10-Fache (Heinz 1986). Die Abbildung zeigt die äußerst komplizierten Abhängigkeiten der kooperativen Effekte von Antikörpern. Beim Lysozym sind die bislang gefundenen Antikörperwirkungen gegen verschiedene Regionen des Moleküls immer kooperativ, nicht reziprok. Wahrscheinlich wird die Effektivität eines polyklonalen Serums sehr stark durch kooperative Interaktionen zwischen Antikörpern gegen verschiedene Epitope bestimmt. (Heinz 1986)



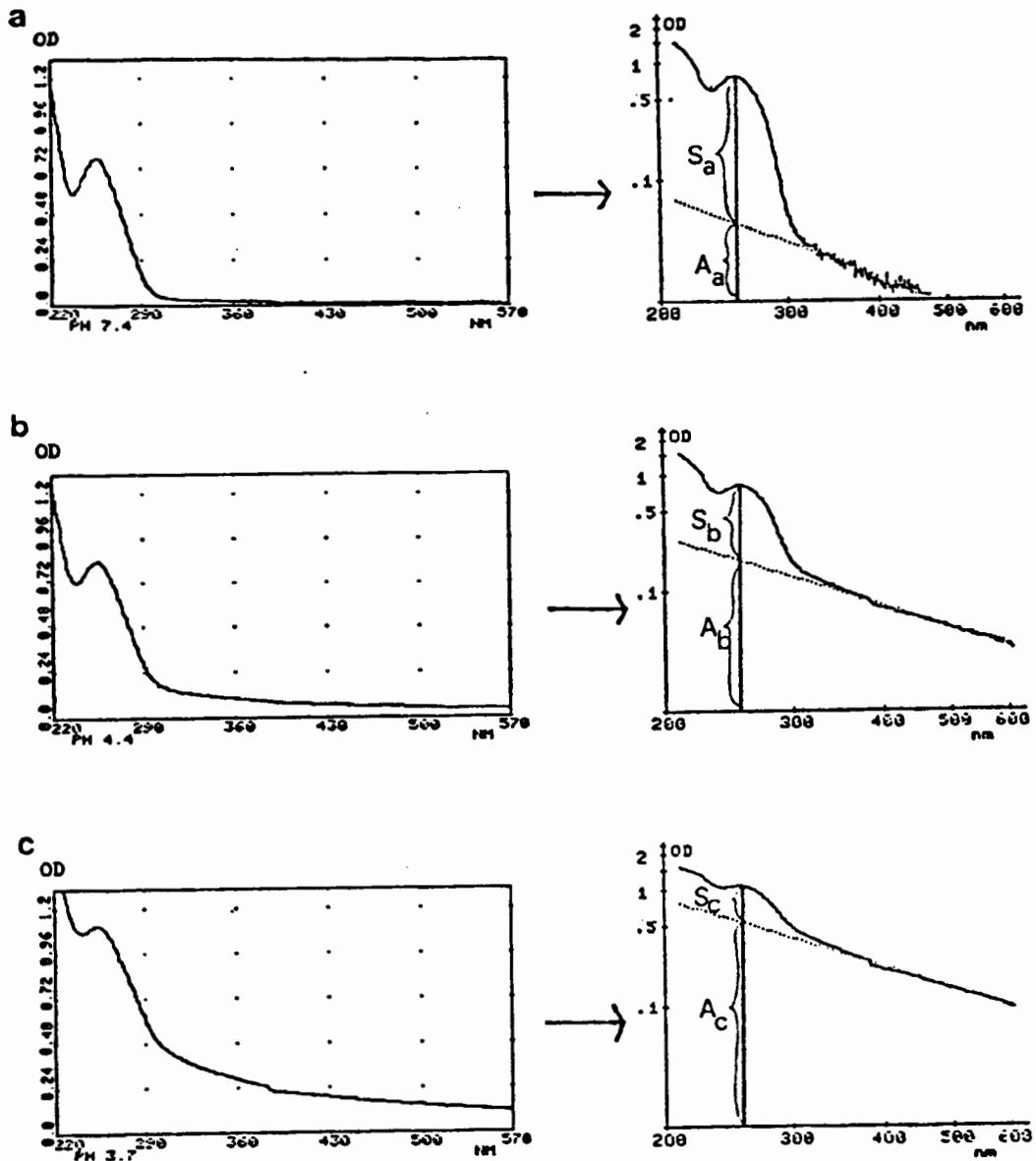


Abb.3.2 Graphische Darstellung der Auftrennung von Aggregation und Absorption: a bei pH 7,4, b bei pH 4,4 und c bei pH 3,7. Die jeweils linke Darstellung zeigt das registrierte Spektrum. Die rechte Darstellung enthält dieselben Werte in doppelt logarithmischer Darstellung. Für Wellenlängen >350 nm ergibt sich in dieser Darstellung eine Gerade, die in den UV-Bereich verlängert ist. Am Schnittpunkt dieser Gerade mit der Senkrechten bei 260 nm lassen sich der Aggregationsanteil A und der Absorptionsanteil S ablesen. $A_a < A_b < A_c$, $S_a > S_b > S_c$.

3.4.6. Serumtitration

Proben der 3 Poliovirus Typen werden so eingestellt, daß sich in 0,5 ml PBS eine optische Dichte bei 260 nm zwischen 0,3 und 0,8 ergibt. Als Referenz dient eine zweite Küvette mit demselben Volumen an PBS. Die Küvetten werden bei 25°C thermostatisiert. Auf dieselbe Art wie bei der pH-Titration werden Spektren zwischen 240 und 500 nm aufgenommen.

In beide Küvetten wird nun die gleiche Menge an Serum, Hybridomaüberstand oder Ascites pipettiert und je ein Spektrum gegen die Referenzküvette aufgenommen. Der Computer verarbeitet die Daten so, daß die Daten der "Serumkontrolle" von denen der "Serum-Virus-Probe" abgezogen werden. Die OD der Viren und ihrer Aggregation (Petersen 1986a,b) bleiben übrig und werden gespeichert. Nach und nach werden steigende Mengen an Serum zugegeben und weitere Spektren aufgenommen.

Die Auswertung nach Englander und Epstein erfolgt analog zur pH-Titration. Die OD₂₆₀ der Aggregation durch Antikörper wird berechnet. Die Differenz zur Gesamt-OD ergibt auch hier den Anteil, der durch die Struktur der viralen RNA hervorgerufen wird.

3.4.7. Auftrennung der Poliovirus-Strukturproteine

Die Auftrennung der viralen Strukturproteine erfolgte durch HPLC in Ameisensäure (Heukeshoven & Dernick 1982). Nach dieser Methode liegen die Proteine in Lösung vor und können zur Verwendung verschiedener Puffer eingedampft werden. Isolierungsschritte wie nach der SDS-PAGE (Dernick & Heukeshoven 1986, Tessmer & Dernick 1989) entfallen. Andere Gruppen haben die HPLC-Methode variiert (Itoh et al. 1991).

In meiner Arbeit habe ich mich weitgehend nach dem Protokoll von Harms (1988) gerichtet, deshalb seien hier nur die Abweichungen angeführt.

Zur Isolierung der Strukturproteine werden PV-Partikel TCA-gefällt. Diese Methode wurde gegenüber dem Protokoll von Harms (1988) wie folgt abgeändert: In 3M CsCl bei -20°C eingefrorene Viruspartikel werden aufgetaut; TCA wird bis zu 10% Endkonzentration hinzugefügt; das Ganze wird bei 4°C 30min inkubiert. Der Niederschlag wird 5min bei 12 000 Upm abzentrifugiert und dann mit Aceton gewaschen. Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert und verworfen. Der Niederschlag wird wieder in Aceton aufgenommen und durch Rütteln und Ultraschall resuspendiert. Zentrifugation und Abpipettieren des Überstandes werden wiederholt. Danach wird das Sediment zum Trocknen liegen gelassen. Anschließend wird das Sediment in 6M Guanidinhydrochlorid in 0.2M Tris-HCl-Puffer pH8,3 mit 0,5% Dithioerythrit (DTE) aufgenommen und 30min bei 37°C inkubiert.

Die Trennung der VPs erfolgte auf einer C-18-Säule in 60% Ameisensäure mit einem Acetonitrilgradienten von 0-30% bei 100 bar. Die Detektion erfolgte bei 275nm. (Heukeshoven & Dernick 1985, Heukeshoven & Dernick 1982, Heukeshoven & Dernick 1983, Heukeshoven & Dernick 1988)

3.4.8. Herstellung tryptischer Peptide von VP2

Der größte Teil der Vorversuche wurde aus Kostengründen mit tryptischen Peptiden des Lysozymes durchgeführt, wie bei Harms (1988) beschrieben. Die Sequenz dieser Peptide ist bekannt.

Alkylierung durch Vinylpyridin: Die tryptische Spaltung von Proteinen wird durch freie SH-Gruppen gehemmt, deshalb wurde VP2 vor der Spaltung alkyliert. Dazu wurde das hydrophobe Polypeptid in 1% SDS in 0,2M Tris-HCl mit 0,5% DTE gelöst. Die Lösung wurde 5min gekocht und anschließend 30min bei Raumtemperatur stengelassen. Zu 200µl VP2-Lösung wurden 10µl einer 8%-igen Vinylpyridinlösung in Isopropanol zugegeben und 30min bei 37°C inkubiert. Nach erneuter TCA-Fällung wie oben wurde das Sediment für die Spaltung in einem Ammoniumacetatpuffer aufgenommen, der durch Mischen von 0,1N Essigsäure (99%) und 0,1N Ammoniaklösung (25%) bis zu einem pH von 8 entstand.

In dieser Lösung wurde die Trypsinspaltung wie bei Harms (1988) durchgeführt. Auch die Auftrennung der Peptide erfolgte nach diesem Protokoll. Zum Auftragen wurde die Peptidlösung in 1% TFA überführt. (Heukeshoven & Dernick 1986-1988, Heukeshoven & Dernick 1989, Heukeshoven & Dernick 1982, Hancock et al. 1978)

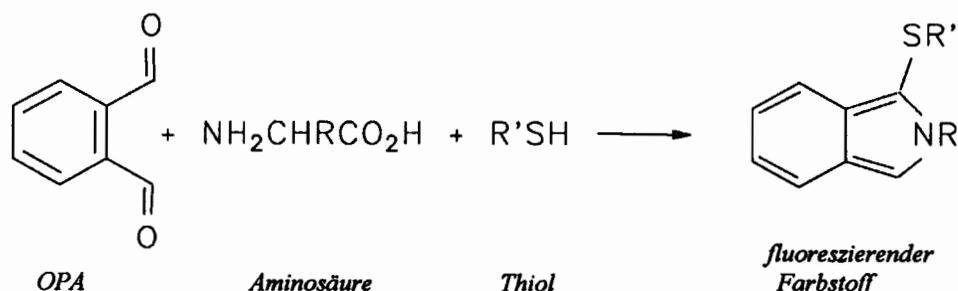
3.4.9. Identifizierung der VP2-Peptide

Nach der Trennung wurden die VP2-Peptide nicht durch Sequenzierung (Wittmann-Liebhold 1989, Bauw et al. 1989), sondern durch quantitative Bestimmung der AS durch Herrn Heukeshoven bestimmt (Dernick & Heukeshoven 1989)(Seite 207-238). Die tryptischen Peptide von VP2 (PV1) sind:

Nr.	Anzahl		Sequenz
	AS	Position	
1	12	1- 12	SPNIEACGYSDR
2	25	13- 37	VLQLTLGNSTITTQEAANSVVAYGR
3	6	38- 43	WPEYLR
4	19	44- 62	DSEANPVDQPTEPDVAACR
5	11	63- 73	FYTLDTVSWTK
6	3	74- 76	ESR
7	5	77- 81	GWWWK
8	6	82- 87	LPDALR
9	16	88- 103	DMGLFGQNMYYHYLGR
10	13	104- 116	SGYTVHVQCNAASK
11	37	117- 153	FHQGALGVFAVPEMCLAGDSNTTTMHTSYQANPGEK
12	19	154- 172	GGTFTGTFTPDNNQTSPAR
	1	173	R
13	28	174- 201	FCPVDYLLGNGTLLGNAFVFPHQIINLR
14	22	202- 223	TNNCATLVLPYVNSLSIDSMVK
15	41	224- 264	HNNWGIAILPLAPLNFASSESSPEIPITLTIAPMCCEFNGLR
16	6	265- 270	NITLPR
17	2	271- 272	LQ

3.4.10. Bestimmung kleinster Aminosäuremengen durch OPA-Mercaptopropionsäure

Da die gängigen Methoden zur Proteinkonzentrationsbestimmung (Golddirektfärbung, OD_{280nm} , BCA- Na_2 , Amidoschwarz, India Ink, Silberfärbung und Fluorescamin) bei unseren geringen Mengen versagten (Damerval et al. 1987, Somerville & Wang 1981, Sutherland & Skerritt 1986, Smith et al. 1985), wurde eine sehr empfindliche Fluoreszenzmethode mit OPA (Ortho-Phthaldialdehyd) ausgearbeitet (Benson & Hare 1975, Roth 1971, Ishida et al. 1981, Abecassis et al. 1985, Qureshi et al. 1984, Cooper et al. 1984, Jones et al. 1981, Froehlich 1989).



Zur Bestimmung der Peptidmenge in einzelnen Tropfen von 1-2 μl auf NC, wie sie in den immunologischen Reaktionen eingesetzt werden konnten, wurde die AS-Konzentration der Peptidlösungen gemessen.

Alle Flaschen, Lösungen und Geräte mußten staubfrei sein!

Dies setzte die Verwendung sauberer HCl (Schwabe & Catlin 1974) zur AS-Hydrolyse sowie das Waschen sämtlicher Gefäße mit 6N HCl, dreimal H_2O (Millipore, MilliQ-Anlage) und Methanol voraus. Zeigte eine Lösung schon vor Zugabe der Probe Fluoreszenz, wurde sie bzw. die ganze Charge verworfen. Bei der Verwendung des Milliporewassers mußte auf den Zustand der Anlage geachtet werden, ein anschließendes Filtrieren störte.

OPA-Stammlösung:

- 50 mg OPA (Ortho-Phthaldialdehyd)
- 4 ml Methanol
- 0,5 ml 1M K-Borat pH 10,4
- 50 μl 3-Mercaptopropionsäure

Diese Mischung ist bei 4°C eine Woche haltbar, sollte am ersten Tag wegen geringer, abklingender Eigenfluoreszenz durch minimale AS-Konzentrationen in der Lösung selbst noch nicht verwendet werden (Jones et al. 1981).

OPA-Reaktion:

Alle Handgriffe müssen im Dunklen ausgeführt werden, um Eigenfluoreszenz zu vermeiden.

1) In Eppendorfhütchen aus fabrikneuer Packung werden je 1 Teil OPA-Stammlösung und 2

Teile Boratpuffer, wie in der Stammlösung, abgefüllt.

2) Die Eppendorfhütchen werden für den Transport zum Fluoreszenzfotometer in der Dunkelkammer in schwarze Filmdosen verpackt.

3) 150µl der Verdünnung werden möglichst lichtfrei in die Küvette pipettiert und die Fluoreszenz kontrolliert.

4) 1µl Probe wird zugegeben.

5) Nach genau 3min wird die Fluoreszenz der Probe abgelesen.

zu OPA-Stammlösung: Das ursprüngliche Rezept enthielt Äthanol. Die Fluoreszenz in methanolischer Lösung erwies sich jedoch als wesentlich stabiler. Da die Fluoreszenz mit Mercaptoäthanol mit der Zeit sank, wurde stattdessen 3-Mercaptopropionsäure eingeführt (Godel et al. 1984). Die Fluoreszenz mit dieser Lösung steigt in den ersten 3min noch leicht an, um dann fast stabil zu bleiben über einen Zeitraum, in dem die Messungen sicher durchgeführt werden können.

zu 2: "UV-dichte" Eppendorfhütchen hielten die Wellenlängen, auf die OPA-Eigenfluoreszenz entsteht, nicht ab, deshalb wurden die Filmdosen verwendet.

zu 5: Ein Stabilisieren der Reaktion durch 0,1N Phosphatpuffer pH4, wie für das Originalrezept empfohlen, erwies sich bei der Verwendung von Mercaptopropionsäure als überflüssig.

Als Eichung der Reaktion wurden Kurven mit frisch verdünnten AS-Standardlösungen (Beckmann) hergestellt, mit und ohne Hydrolyse. Die Gültigkeit für Peptide wurde mit Insulin überprüft.

Die Messungen erfolgten in einem Perkin-Elmer-Fluoreszenzfotometer. Nach anfänglicher Benutzung eines ELISA-Platten-Lesers erwies sich die Verwendung von Einzelküvetten als wesentlich empfindlicher und gut reproduzierbar; z.B. wurden 160 eingewogene pMole Lysozym als 151pMole gemessen.

Die optimale Anregungsextinktion wurde bei 330nm ermittelt. Das Maximum der ausgesandten Emmission lag bei 450nm.

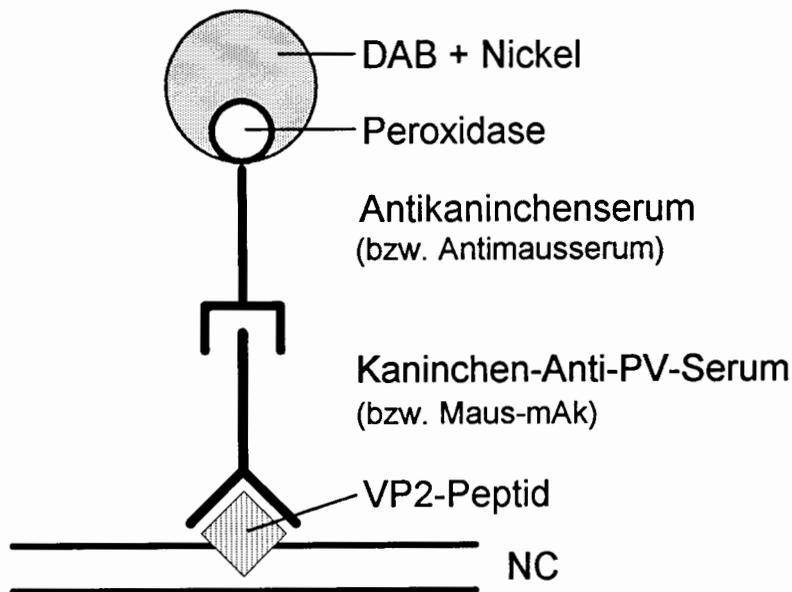
Die Mole der AS bzw Peptide wurden nach Abzug der Eigenfluoreszenz von den gemessenen Fluoreszenzeinheiten (FE) durch Division durch den Faktor 2,5 der Eichkurve bestimmt.

$$\text{pMole} = (\text{FE} - 70) : 2,5$$

Verdünnungen wurden extra berücksichtigt. Gute Kontrollen enthielten 70-90FE. Durch Licht entstanden leicht 110FE. Verunreinigte Proben zeigten Werte im nMol-Bereich. Unter Berücksichtigung der mit OPA reagierenden AS entsprachen die Mengen direkt bestimmter Peptide denen, die nach Hydrolyse bestimmt wurden. Die kleinste im Dot-Test verwendete Menge an Lysozympeptid war 216pmol. Sie reagierte in der Immunreaktion noch positiv. Auch die kleinste Menge Polio-VP2- Peptid, 9,4pmol T2, war positiv.

3.4.11. Dot-Test

Der Dot-Test dient dazu, die Antigenität kleiner Mengen von Proteinen oder Peptiden zu bestimmen, indem Tropfen von Proben auf fester Matrix gebunden und mit Antikörperlösungen inkubiert werden. Der hier verwendete Test wurde in jedem Schritt optimiert (siehe Kommentar).



- 1) Nitrozellulosestreifen (NC; 0,2µm) werden 30min bei 22°C in 0,2% BSA inkubiert.
- 2) Streifen heftig in H₂O bidest abspülen.
- 3) 1h bei 22°C in 0,1% Glutaraldehyd in PBS schütteln.
- 4) NC leicht antrocknen lassen und Proben von 1-2µl auftragen.
- 5) Antrocknen lassen.
- 6) 1h bei 37°C in feuchter Kammer stehen lassen.
- 7) 1h in 1% Ethanolamin in 0,1% Tween 20 in PBS bei 22°C leicht schütteln.
- 8) 2 x waschen in PBS mit Tween (s. o.)
- 9) Inkubation mit Testserum oder monoklonalen Antikörpern (Konzentration je nach Lösung verschieden; Serum etwa 1:250, Ascites 1:100 verdünnt) in PBS mit Tween über Nacht bei 22°C
- 10) 5 x 2min in PBS mit Tween heftig schüttelnd waschen.
- 11) 2h bei 22°C in Antikaninchen- bzw. -mausserum mit Gold- oder Peroxidase markierung leicht schüttelnd inkubieren. Verdünnung in PBS mit Tween: 1:500 für Peroxidaseseren; 1:1000, 1:2000 für Goldseren.

zu1: Die Bindung der Peptide an BSA war der Direktauftragung von Peptiden und der direkten Bindung von Peptiden an NC durch Glutaraldehyd in der Immunreaktion deutlich überlegen. Die BSA-gebundenen Peptide reagierten auch wesentlich besser als über Epoxy- oder Bisoxiranaktivierung (Porath et al. 1975) an regenerierte Zellulose gebundene Peptide. Auch die kovalente Bindung der Peptide konnte die Hintergrundfärbung nicht vermeiden helfen. - Die NC durfte nicht zu alt und der Luft ausgesetzt sein. Immobilon und andere Folien banden zwar z.T. höhere Proteinkonzentrationen, zeigten aber bei den verwendeten niedrigen Konzentrationen keinen Vorteil, sondern ergaben höhere Hintergrundfärbungen, und nicht alle der auf NC gefundenen Reaktionen wurden wiedergefunden. (Matsudaira 1987) Höhere BSA-Konzentrationen führten zu höherer Hintergrundfärbung, niedrigere zum Verschwinden einiger Reaktionen. Das Optimum lag bei 0,2% BSA. Außerdem war BSA anderen Beschichtungen, Phenylalanin, Threonin, α -Amylase, Gelatine (van der Sluis et al. 1987, van der Sluis et al. 1988) und Laktalbumin, überlegen.

zu2: Das heftige Spülen mit Wasser entfernt überschüssiges BSA.

zu3: 0,1% Glutaraldehyd waren ausreichend, höhere Konzentrationen ergaben mehr Hintergrund. Formaldehydfixierung ergab einen helleren Hintergrund, einige Punkte fehlten jedoch in der Immunreaktion.

zu 4: Die deutlichsten Punkte wurden durch Probenauftrag auf leicht angetrockneter NC erzielt. Naß verliefen die Proben, mit untergelegtem Filterpapier wurden sie zu stark durchgesaugt, und Fönen konnte sie verwischen.

zu 5: Intensiveres Antrocknen, Anbacken für 30min bei 60°C konnte zumindest in meinen Händen die Reaktion nicht verbessern oder mehr Protein binden (Nachweis z.B. durch Amidoschwarz), sondern führte zu Schmutz im Hintergrund.

zu 6: Ursprünglich wurde dem Wasser der feuchten Kammer N-Ethylmorpholin zugegeben. Es erwies sich jedoch als wirkungslos und wurde deshalb weggelassen.

zu 7: Verkürzung der Inkubation in Ethanolamin ergab mehr Hintergrund, wahrscheinlich weil das freie Glutaraldehyd noch nicht abgesättigt war. Höhere Ethanolaminkonzentrationen verfärbten die NC gelb. Tris, Glycin, Lysinchlorid oder Borhydrid sowie Titration der Ethanolaminlösung auf pH 7,7 konnten die Glutaraldehydabsättigung nicht verbessern.

zu 8: 0,1% Tween 20 verhinderte eine Anfärbung des Hintergrundes. Es ist das Blockierungsmittel, das verhindert, daß noch weitere Proteine auf der NC binden. Verwendet man Blockierungsmittel mit höherem Molekulargewicht, wie Proteine, so besteht die Gefahr, daß ein Teil der Peptide überdeckt wird. Tween verhindert auch die Reaktion von Antikörpern mit der Matrix. (Mohammad & Esen 1989) SDS (Smith et al. 1989) führte genau wie höhere Tweenkonzentrationen zu weniger Hintergrund, aber auch zu weniger positiven Punkten. Triton und PEG eigneten sich nicht für die Methode. Durch BSA in allen Puffern wurde der Hintergrund verbessert, aber die Methode zu aufwendig (Hsu 1984). Kälberserum verdeckte einen Teil der positiven Punkte, Pferdeserum noch mehr; der Hintergrund blieb hell. Die Ergebnisse mit Schweineserum entsprachen denen mit Tween, aber Peptid T10_{Lysozym} fehlte.

zu 9: Kürzere Inkubationszeiten mit dem primären Ak führten zu hellerem Hintergrund, aber auch weniger sichtbaren Reaktionen. Bei längeren Zeiten scheint Tween das BSA von der Folie zu lösen (Tovey et al. 1989). NaN_3 , gegen Mikroorganismen, in längeren Inkubationen zerstört die Peroxidasereaktion.

zu 11: 2h waren die optimale Zeit zur Reaktion der sekundären Ak. Wegen der Peroxidase mußten die Streifen immer feucht gehalten werden, denn schon nach 5-10min im Trockenen ist die Peroxidaseaktivität stark verringert. Außerdem muß das Enzym frisch verdünnt werden, da es auch in Lösung im Laufe eines Tages deutlich abnimmt (Merril & Pratt 1986). Starkes Schütteln verschlechtert die Reaktion. DAB-Färbung nach Peroxidaseantikörpern ergab empfindlichere Färbungen als Phosphatasereaktionen. Man kann nicht grundsätzlich sagen, Färbung über Gold-Ak oder Phosphatase-Ak sei besser. So ist die Goldfärbung nach Moeremans et al. (1984) nur deshalb besser, weil als Vergleich das weniger sensible Peroxidasekit von Janssen Pharmaceutica verwendet wurde. Gold- und DAB-Färbung sind im großen und ganzen gleich sensibel. Das sekundäre Serum mußte in niedrigen Konzentrationen verwendet werden, um Hintergrundfärbung zu vermeiden. (Wu et al. 1989, Hyatt et al. 1988)

Zur Nachweisgrenze des Dot-Tests: Da immunbiologische Reaktionen zwischen Antigen und Antikörper individuelle Reaktionen sind, die für jede einzelne Reaktion neu bestimmt werden müßten, ist eine Angabe eines allgemeinen Wertes der Nachweisgrenze unsinnig. Im folgenden sei jedoch versucht, die 4-Chloro-1-naphthol (CN)-reaktion in Abwesenheit von BSA mit der von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) mit BSA-Beschichtung zu vergleichen. Die Nachweisgrenzen sind für ganzes Lysozym (L) und Lysozympeptid 10 (T10) angegeben, in Klammern die Werte von Harms (1988).

	L	T10	L	T10
	ng	ng	pMol	nMol
-BSA/CN	3,3	36	0,23	16
+BSA/DAB	3,3 (1,1)	43 (128)	0,23 (0,8)	19 (56)

Wie die Tabelle zeigt, entsprechen sich die Methoden bis auf graduelle Unterschiede. Wichtig war jedoch, daß die Anzahl reagierender Peptide zunahm.

3.4.12. DAB-Ni-Methode

Als empfindlichste Farbreaktion zum Nachweis der Ak erwies sich die DAB-Methode (3,3'Diaminobenzidin) von Gallyas (Gallyas et al. 1982, Gallyas 1988, Kobayashi & Tashima 1989, Young 1989). Diese Methode wurde wie folgt abgewandelt:

- 1) Seruminkubierte NC-Streifen 2 x gründlich in PBS mit Tween waschen
- 2) 3 x je 2min in 0.05M Tris-Puffer pH7,6 unter leichtem Schütteln waschen

DAB-Reaktionsmischung: in der angegebenen Reihenfolge zugeben

1. 7mg NiCl_2
2. 9,6ml 0,05M Tris-HCl pH7,6
3. 2mg DAB in 0,4ml H_2O
4. 7 μ l 30% H_2O_2

3) Streifen < 10min in DAB-Reaktionslösung bei 22°C inkubieren bis zur gewünschten Färbung. Vorsicht, die Reaktion ist lichtempfindlich! Dunkel halten.

4) Wiederholt mit H_2O waschen und wenn möglich feucht fotografieren.

Eigentlich enthält die Methode noch eine Silberverstärkung des Nickels; diese führte jedoch im Dot-Test - wie eine ganze Reihe anderer Verstärkungsmethoden auch - zur totalen Überfärbung des Hintergrundes. (Holgate et al. 1983, Hacker et al. 1988) Da die der Silberfärbung vorangehende Zugabe von NiCl_2 allein eine Verbesserung der Färbung ergab, wurde sie trotz des Weglassens der Silberanlagerung beibehalten.

zu 2: Der Tris-Puffer allein zeigte die besten Ergebnisse. SDS oder pH4 schwächten die Färbung, und Tween erhöhte den Hintergrund drastisch.

zu DAB-Reaktionsmischung: Die Zutaten sollten der Reihe nach zugegeben werden, da es sonst zu Fällungsreaktionen kommen konnte, wie eigene Versuche bestätigten. Achtung! DAB ist krebserregend, deshalb sollte bei allen folgenden Schritten mit Handschuhen gearbeitet werden. DAB sollte immer frisch verwendet werden; d.h. die feste Substanz muß eingefroren aufbewahrt werden. Für die Versuche wurde eine DAB-Stammlösung angesetzt (s.o.), die in gebrauchsfertigen Portionen tiefgefroren aufgehoben wurden. (Nicht eingefrorenes DAB kann zwar durch Filtration gereinigt werden, die Lösung verträgt sich jedoch nicht mit Metall, und jedes unnötige Hantieren sollte vermieden werden (s.o.)

zu 3: Tween erniedrigte den Hintergrund der Farbreaktion, aber auch die Empfindlichkeit des Tests. (Thean & Toh 1989) Ebenso verhielt es sich mit einer Gelatineüberschichtung (Danscher & Nörngaarg 1983, Pohl et al. 1988).

3.4.13. Hauptsächlich verwendete Computerprogramme

3.4.13.0. Verwendete Daten:

Die in dieser Arbeit verwendeten PV- Sequenzen sind der Swiss Protein Bank entnommen:

Abkürzung	Bankzitat	Typ	Bemerkung
1M	POLH\$POL1M	wt 1	Mahoney, Baltimoresequenz
1S	POLG\$POL1S	Sabin 1	
2L	POLG\$POL2L	wt 2	Lansing
3L	POLG\$POL3L	wt 3	Leon

Die Strukturdaten für Poliovirus Typ 1 wurden der Datei "2PLV" in der Version vom Oktober 1981, revidiert im Juli 1990, entnommen (Filman et al. 1989, Hogle et al. 1989, Page et al. 1988, Hogle et al. 1988, Ypma-Wong et al. 1988, Martin et al. 1988, Hogle et al. 1987b, Chow et al. 1987, Hogle et al. 1986, Hogle et al. 1985). Die Datei ist Teil der Protein Data Bank (Bernstein et al. 1977, Abola et al. 1987) am Brookhaven National Laboratory.

3.4.13.1. Programme zur Auswertung der optischen Dichte:

- 1) Zur Erstellung der Spektren von Virussuspensionen bei pH-Titration und Zugabe von Ak-Lösungen wurde die zum Ultraspecfotometer von LKB mitgelieferte Software in leicht abgeänderter Version benutzt.
- 2) Die Auswertung zur Auftrennung von Streuung und Absorption erfolgte durch das Programm "Scatter". (Bergmann & Bergmann 1988)

3.4.13.2. Programme zur Struktur bzw Antigenitätsuntersuchung:

B-Zell-Epitopsuche:

Alle Vorhersagekalkulationen benutzen Bewertungsskalen der 20 AS. (Ist eine AS oft von der Oberfläche zugänglich, so ist sie auch meist hydrophil und beweglich.) Viele Skalen enthalten Verteilungskoeffizienten zwischen zwei verschiedenen Phasen. Zugänglichkeit und Beweglichkeit kommen aus der dreidimensionalen Struktur; bei Zugänglichkeit wird die äußere Oberfläche gemessen, die Beweglichkeit wird durch den atomaren Temperaturfaktor (B-Wert) aus der Röntgenstrukturanalyse erhalten. Die Verteilung in Helices oder anderen Strukturen wird aus der Häufigkeit der AS in den betreffenden Strukturen bekannter Proteine bestimmt. Wenn Profile ausgegeben werden, sind die Werte nicht für eine einzelne AS angegeben, sondern es wird über ein "Fenster" aus mehreren AS (meist 5-7 bei Antigenitätsprogrammen) ein Mittelwert gebildet. Bei Karplus & Schulz (1985) wird das Fenster von 7AS gewichtet,

0,25/0,5/0,75/1/0,75/0,5/0,25, andere benutzen die Gaußsche Verteilungskurve. (Pellequer et al. 1991) So gelten die unter einer AS angegebenen Werte immer als Mittelwert, der etwa 5-7 AS in der Nachbarschaft einbezieht. Ich habe von allen PV-Proteinen durch ein Schreibprogramm Teilstücke der Sequenzen hergestellt, die klein genug waren, daß die Programme sie verarbeiten konnten. Die Teilstücke haben sich überlappt, um Ungenauigkeiten der Enden zu vermeiden. Nach Ansicht der Profile wurden Grenzwerte eingeführt, so daß aus den ausgedruckten Tabellen z.B. besonders hohe Hydrophilität abgelesen werden konnte. Die über den Grenzwerten liegenden Werte wurden in den Tabellen markiert. Sie sollen einen rauen Überblick über die große Menge an Daten ermöglichen. Die wenigen in dieser Arbeit angeführten Programme ergaben die markantesten Profile.

Da die atomare Struktur von PV bekannt ist, wurden zur näheren Charakterisierung aus einer großen Anzahl von Programmen zur Struktur solche ausgewählt, die weitere Angaben über die Art der AS enthalten. Einige dieser Programme stammen aus der Sammlung EPIPLOT (Menéndez-Arias & Rodriguez 1990) zur Vorhersage von B- und T-Zell-Epitopen.

1) Die verwendete Methode zur Bestimmung der Hydrophilität beruht auf einer Skala, die durch Untersuchung von 20 Modellpeptiden entstand. In diesen Peptiden wurden 2AS der Reihe nach durch sämtliche AS ersetzt und getestet. Außerdem berücksichtigt das Programm Flexibilität, Zugänglichkeit und das Hydrophilitätsprogramm von Hopp & Woods (1981). Das Programm erlaubt so bedingt eine Vorhersage der Antigenität. (Parker et al. 1985)

2) "Ungeordnete" Strukturen bieten besondere Merkmale, deshalb sind Kurven und Knicke besonders antigen. Aus diesem Grund wurde ein Programm zur Bestimmung der β -Turns mit in der Tabelle aufgeführt. (Chou & Fasman 1978)

3) Die Beweglichkeit der AS wurde nach Karplus & Schulz (1985) bestimmt (s.o.).

T-Zell-Epitopsuche:

Da immer deutlicher ein Zusammenhang in der Lage von B- und T-Zell-Epitopen gesehen wird, habe ich auch die möglichen T-Zell-Epitope bestimmt.

1) und 2) Die T-Zell-Epitope der verschiedensten Organismen weisen Ähnlichkeiten auf, die zur Suche neuer Epitope genutzt werden können. Im ersten Motif haben die 4 AS folgende Eigenschaften: geladen oder G, hydrophob, hydrophob, polar oder G. Im zweiten Motif sind 5 AS: geladen oder G, hydrophob, hydrophob, hydrophob, polar oder G. (Rothbard & Taylor 1988)

3) Das dritte Programm beruht auf der Bindung des Maus-MHC an Ovalbumin und der Wahrscheinlichkeit mit der AS in diesem Epitop ausgetauscht werden können. Die Motive werden in vielen Organismen wiedergefunden. (Sette et al. 1989)

4) Programm 4 gibt an, an welchen Stellen das "denaturierte" Protein die Möglichkeit hat, eine amphipatische Helix zu bilden, die vom MHC präsentiert werden kann. (Stille et al. 1987) Es sucht hydrophobe Streifen auf der Helix. Die hydrophoben AS nehmen dabei die Positionen n, n+4, n+7, n+11, n+14, n+18 ein, liegen also auf einer Seite der Helix.

Die ausgedruckten Tabellen sollten so verstanden werden, daß in ihnen nachgesehen werden kann, in welchen Regionen der Polioviren mit weiteren antigenen Regionen zu rechnen ist. Außerdem sollten sie bei der Wahl von Peptiden zur Induzierung von Antikörpern Verwendung finden.

3.4.13.3. Programme zur Homologiesuche:

1) Für das grobe Alignment der PV-Sequenzen wurde das Programm MACAW benutzt. Die Homologie wurde so dargestellt, daß möglichst wenig Lücken entstanden und die Numerierung wenig Änderungsstellen brauchte. Zusätzliche kurze Homologien in kleinen Bereichen können mit den Augen gesucht werden; meist sind es nur Verschiebungen um einzelne AS. Die Numerierung wurde strikt den Daten nach beibehalten. (Schuler et al. 1991)

2) Genaue Vergleiche der Sequenzen, besonders die Homologien zwischen den Peptiden von VP2 (PV1), wurden mit dem Programm psm von Gotoh (1990) durchgeführt.

3.4.13.4. Programm zur Darstellung räumlicher Strukturen:

Zur Darstellung der Struktur wurden die Daten der Brookhaven-Datenbank entnommen und mit dem Zeichenprogramm MOLSCRIPT von Kraulis (1991) bearbeitet.